Auftreten von freien leichten Ketten der Immunglobuline im Urin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Ulf Janzik
1977

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544321_0057

Aus der I. Medizinischen Klinik A

der Universität Düsseldorf

Komm. Dir.: Prof. Dr. med. W. Pöttgen

Auftreten von freien leichten Ketten der Immunglobuline im Urin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ulf Janzik

1977

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Kindler

Korreferent
gez.: Priv.-Doz. Dr. Trobisch

INHALTSANGABE

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	4
2	UNTERSUCHUNGSGUT	6
3	METHODIK	7
3.1	Untersuchungsmaterial	7
3.2	Konzentration mit Millipore Ultrafiltration	9
3.3	Qualitativer Eiweißnachweis	11
3.3.1	Trägerelektrophorese	11
3.3.2	Immunelektrophorese	12
3.4	Quantitative Proteinbestimmung	14
3.4.1	Gesamteiweißbestimmung nach der Biuretmethode mit und ohne TCA-Fällung	14
3.4.2	Radiale Immundiffusion nach Mancini	17
4	ERGEBNISSE	19
5	DISKUSSION	24
6	ZUSAMMENFASSUNG	29
7	LITERATUR	31

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Immunglobuline werden im Körper von einzelnen Zellklonen produziert. Jedes Immunglobulin ist aus schweren Ketten (heavy-chains, H-Ketten) und leichten Ketten (light-chains, L-Ketten) zusammengesetzt.

Die leichten Ketten werden in zwei verschieden antigene Typen unterteilt, L-Ketten vom Typ $\varkappa$ (k) und L-Ketten vom Typ λ . Ein einzelnes Immunglobulin besitzt nur einen Typ von L-Ketten.

Treten diese leichten Ketten ohne an ein Immunglobulin gebunden zu sein als freie leichte Ketten (sogenannte Bence-Jones-Proteine) im Urin auf, so spricht man von einer Bence-Jones-Proteinurie [Putnam, F. W.; Solomon, A.; Wetter, O.; Berggard, I.] .

Die überschießende oder sich verselbständigende Produktion eines Immunglobulin produzierenden Zellklons ergibt das Bild der mono- oder oligoklonalen Gammopathie oder Paraproteinämie. Die Differenzierung der einzelnen Paraproteinämieformen orientiert sich unter anderem am Auftreten von freien leichten Ketten der Immunglobuline im Urin.

Eine positive Bence-Jones-Proteinurie kann der Hinweis auf das Vorliegen einer sogenannten obligaten Paraproteinämie sein, das heißt eines Plasmocytoms oder einer Makroglobulinämie Waldenström [Waldenström, J.] .

Spätere Untersuchungen zeigten, daß freie leichte Ketten auch

bei den benignen Paraproteinämieformen, den sogenannten fakultativen und idiopathischen monoklonalen Gammopathien auftreten [Dammacco, F.; Waldenström, J.] .

Hobbs gibt eine Grenzausscheidungsmenge für freie L-Ketten von 50 mg/l an, bis zu der noch eine benigne Paraproteinämieform vorliegt, wird diese Menge überschritten, so ist hiernach eine obligate monoklonale Gammopathie wahrscheinlich.

Entsprechend der Sensibilität der Nachweismethode lassen sich Bence-Jones-Proteine auch im Urin von Gesunden nachweisen [Solomon, A.; Williams, C. R.; Vaughan, J. H.; Berggard, I.; Lindström, F. D.] .

Im Folgenden soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit bei fehlender monoklonaler Gammopathie freie leichte Ketten der Immunglobuline im Urin auftreten.

Weiter soll untersucht werden, welchen Einfluß eine angestiegene Immunglobulinsyntheserate bei Patienten mit Hepatopathien und der veränderte Metabolismus bei Patienten mit Nephropathien auf das Auftreten und die Menge der ausgeschiedenen freien leichten Ketten im Urin haben.

2 UNTERSUCHUNGSGUT

Aus dem Patientengut der I. Medizinischen Klinik A der Universitätskliniken Düsseldorf wurden für diese Untersuchung vom 1.1.1976 bis zum 31.8.1976 Patienten unter folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

Als Vergleichskollektiv (n = 27) wurden Patienten ausgesucht, die nach katamnestischer Erhebung im Bezug auf diese Untersuchung als Normalpersonen anzusehen waren.

Die Patientengruppe mit Nierenerkrankungen (n = 17) wurde folgendermaßen aufgeteilt:

Patienten mit Glomerulonephritis (n = 10)

Patienten mit Niereninsuffizienz; Patienten mit nephrotischem Syndrom, soweit nicht unter Glomerulonephritis erfaßt (n = 4)

Patienten mit Pyelonephritis (n = 3)

Die Patientengruppe mit Lebererkrankungen (n = 18) wurde in

Patienten mit akuter Hepatitis (n = 10) und

Patienten mit Lebercirrhose oder Fettleber (n = 8) unterteilt.

Insgesamt wurden nur die Patienten berücksichtigt, bei denen das Vorliegen eines monoklonalen Immunglobulins im Serum immunelektrophoretisch sicher ausgeschlossen war.

3 METHODIK

3.1 Untersuchungsmaterial

Der Urin wurde über 24 Stunden in 2500 ml-Kunststoffgefäßen gesammelt.

Vor Beginn der Sammelperiode wurde in die Gefäße Natriumazid (1) gegeben, um das Bakterienwachstum zu hemmen. Dabei mußte die Konzentration an Natriumazid größer als 3 g/l sein, um das Wachstum wirksam zu hemmen [Laux, P.] .

Vor der weiteren Verarbeitung wurde der Urin filtriert (2).

Danach wurden Proben des nativen Urins entnommen und für weitere Bestimmungen bei -20°C eingefroren (2 x 5 ml, 5 x 1 ml).

Zum qualitativen Eiweißnachweis wurde im nativen Urin die Sulfosalicylsäureprobe durchgeführt.
(Bewertung: ∅ negativ, (+) fraglich positiv,
+, ++, +++ positiv)

Das Volumen des verbleibenden Urins wurde gemessen.

Insgesamt gestaltete sich der Untersuchungsgang gemäß Abb. 1 .

---

(1) Hersteller: E. Merck, Darmstadt

(2) Papierfilter Nr. 595
Hersteller: K. Schleicher und Schüll

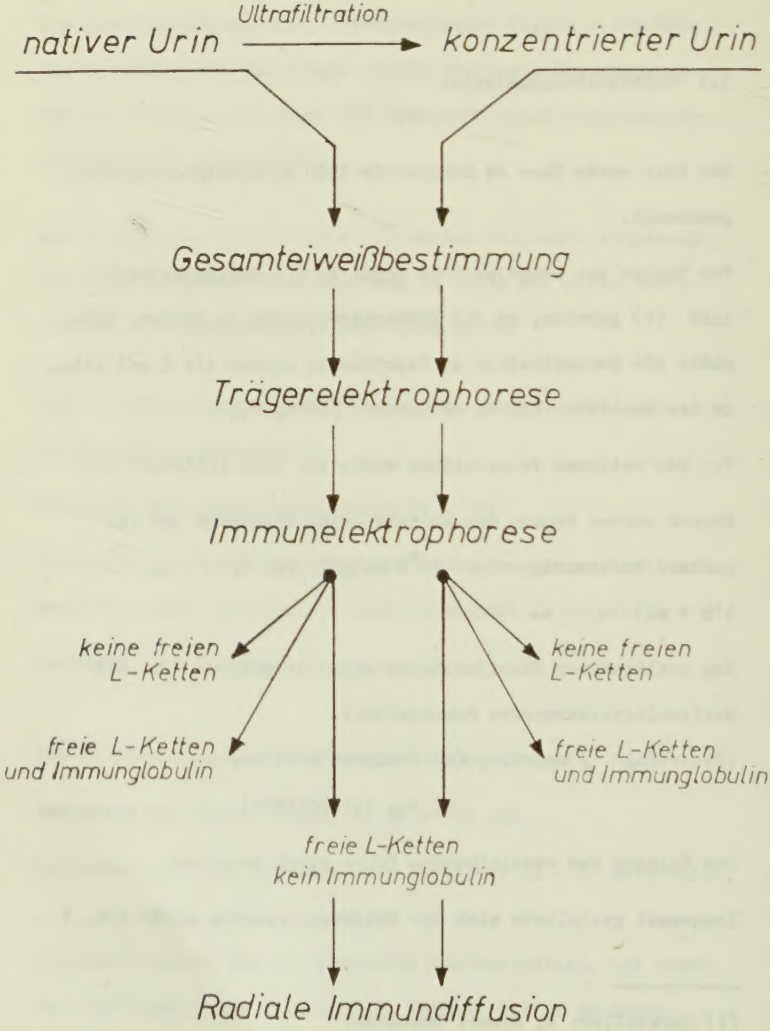

Abb. 1: Übersicht der Methodik

3.2 Konzentration mit Millipore Ultrafiltration

Die Konzentration der Urine wurde in einer Millipore-142mm-Hochleistungszelle durchgeführt (1).

Es wurden Molekularfilter mit einer Nominal-Molekulargewichtsgrenze von 1000 (2) und Stützmembranen vom Typ GSWP 14250 benutzt [Dirks, E.; Millipore Publications AR 801] .

Der einzelne Urin wurde dann bei einem Stickstoffdruck von 7 bar und einer anfänglichen Rührstärke von 5 eingeengt. Sank gegen Ende des Konzentrationsvorganges die Durchflußrate ab, so mußte die Rührstärke um ein bis zwei Stufen erhöht werden. Die Urine wurden mit dieser Anordnung so weit wie möglich konzentriert. Die Grenze lag hier bei einer Rückstandsmenge von 15 bis 20 ml, um Volumenmeßfehler möglichst gering zu halten. Die Einengung wurde spätestens zu dem Zeitpunkt beendet, an dem die Durchflußrate null betrug.

Durch Ausgießen der Filtrationseinheit wurde der Rückstand so vollständig wie möglich zurückgewonnen und in einzelnen Portionen für spätere Untersuchungen bei -20°C eingefroren.

---

(1) Millipore Hochleistungszelle XX4214252

(2) Molekularfilter Typ Pellicon 1000 BAC 14205
Hersteller: Millipore GmbH, Neu Isenburg

Durch Messen des Ausgangs- und des Endvolumens ließ sich der Konzentrationsfaktor berechnen. Die einzelnen Konzentrationsfaktoren lagen hier im Bereich von 10 bis 100, je nach Ausgangsvolumen und Eiweißgehalt des einzelnen Urins.

Um die Funktionstüchtigkeit der Anlage und die Qualität der Membran zu überprüfen, wurde die Sulfosalicylsäureprobe nicht nur im nativen Urin, sondern auch im Ultrafiltrat durchgeführt. Die Ultrafiltrationsmembran wurde zusätzlich nach jedem Filtrationsvorgang mittels Dextran blue (MGW: 2×10^6) (1) auf Nichtdurchlässigkeit geprüft.

Um keine Proteine zu verschleppen, mußte nach jeder Konzentration die Filtrationseinheit gründlich gereinigt werden. Die Ultrafiltrationsmembranen wurden über eine halbe Stunde in verdünnter Essigsäure regeneriert, für jeden Urin wurde eine neue Stützmembran verwandt.

Bei dieser Konzentrationsmethode wurden deshalb Ultrafiltrationsmembranen mit einer Nominal-Molekulargewichtsgrenze von 1000 gewählt, weil diese Membranen laut Millipore für Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als 10 000 einen Abscheidungsgrad von 100% haben. In einem Vorversuch zur Recovery von Pellicon-Membranen 1000 wurde für Moleküle mit einem Gewicht von 21 000 ein Abscheidungsgrad von 97% angegeben [Dirks, E.].

---

(1) Hersteller: Serva, Heidelberg

Der Vorteil dieser Methodik ist dadurch charakterisiert, daß durch den Einengungsvorgang keine freien leichten Ketten (MGW > 22 000) verlorengehen.

Durch die Wahl dieser Membranen muß man aber auch einige Nachteile, die sich gerade bei eiweißhaltigen Urinen bemerkbar machen, in Kauf nehmen. Die Durchflußrate sinkt beim Einengen eiweißhaltiger Urine schnell stark ab und läßt sich auch durch Erhöhung der Rührstärke nicht verbessern. So bleibt trotz hohen Zeitaufwandes, der bis zu 48 Stunden betragen kann, die Endmenge verhältnismäßig groß.

Durch die Tatsache, daß man Urine unabhängig vom Ausgangsvolumen nur bis zu einer Endmenge von ungefähr 20 ml bzw. bis zum Absinken der Durchflußrate auf null konzentrieren kann, sind dieser Methodik Grenzen gesetzt.

3.3 Qualitativer Eiweißnachweis

3.3.1 Trägerelektrophorese

Bei genügend großer Eiweißkonzentration wurde sowohl im nativen, als auch im konzentrierten Urin die Trägerelektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folie durchgeführt. (1)

---

(1) Hersteller: Sartorius, Göttingen

Für die Untersuchung wurden eine Boskamp-Elektrophoreseausrüstung und ein Boskamp-Auftragstempel benutzt. (1)

Wegen der oftmals geringen Eiweißkonzentrationen mußten die einzelnen Proben bis zu neunmal aufgetragen werden.

Die Messung und Auswertung erfolgte in einem Extinktions-Integralschreiber der Firma Zeiss. (2)

3.3.2 Immunelektrophorese

Im nativen und im konzentrierten Urin wurde die Immunelektrophorese nach Scheidegger durchgeführt. Die Ausführung erfolgte nach Kindler in einer LKB-Elektrophoreseausrüstung.

Folgende Antisera wurden gebraucht:

Polyspezifische Antisera:

Anti-Human-Serum vom Pferd (3)

---

(1) Hersteller: Boskamp Gerätebau KG, Hessel

(2) Hersteller: Zeiss, Aalen

(3) Best. Nr. ØRCØ 04
Hersteller: Behringwerke, Marburg

Monospezifische Antisera:

Anti-Bence-Jones-Protein (freie k-Kette)

Serum von der Ziege (1)

Anti-Bence-Jones-Protein (freie λ-Kette)

Serum von der Ziege (2)

Precipating antiserum against human BJ kappa

Serum vom Kaninchen (3)

Precipating antiserum against human BJ lambda

Serum vom Kaninchen (4)

Als Kontrollsera wurden benutzt:

Gepooltes Humanserum (selbst hergestellt)

Bence-Jones-Protein / Typ k Kontrolle (human) (5)

Bence-Jones-Protein / Typ λ Kontrolle (human) (6)

---

(1) Best. Nr. ØTNN 04

(2) Best. Nr. ØTNO 04

Hersteller: Behringwerke, Marburg

(3)

Hersteller: Organon Teknika, München

(4)

(5) Best. Nr. ØTEU 02

(6) Best. Nr. ØTEV 02

Hersteller: Behringwerke, Marburg

Die Ergebnisse der Immunelektrophorese bestimmten das weitere Vorgehen. Die Urine, bei denen im Konzentrat freie leichte Ketten vom k- und /oder λ -Typ nachgewiesen wurden, konnten weiter ausgewertet werden.

Aus der Immunelektrophorese mit polyspezifischem Anti-Human-Serum wurde das Vorhandensein eines noch intakten Immunglobulins festgestellt. Nur die Urine, die zwar freie leichte Ketten aber kein intaktes Immunglobulin enthielten, konnten dann mit der radialen Immundiffusion nach Mancini quantitativ ausgewertet werden.

3.4 Quantitative Proteinbestimmung

3.4.1 Gesamteiweißbestimmung im Urin nach der Biuretmethode mit und ohne TCA-Fällung

Zur Bestimmung des Gesamteiweißes im Urin wurde die Biuretmethode nach Weichselbaum benutzt.

Da die einzelnen nativen Urine und gerade die Konzentrate unterschiedlich starke Eigenfarben hatten - z.B. Urine von Patienten mit akuter Hepatitis - , mußte jeweils ein Probenleerwert, der ohne Kupfersulfat angesetzt wurde, mitgeführt werden. Es wurde die Extinktion des Probenleerwerts gegen aqua dest. gemessen und die erhaltene Extinktion von der der Probe subtrahiert.

Die Eiweißbestimmungen nach dieser Methode ergaben unter Umständen falsch hohe Werte. Es ergaben sich Widersprüche zur Sulfosalicylsäureprobe und zum errechneten Konzentrationsfaktor. Außerdem führten Farbumschläge nach grün, braun und rot zu Falschbestimmungen.

Diese Gegebenheiten können durch folgende Überlegung zumindest teilweise erklärt werden. Bei der Konzentration mit Hilfe der Millipore-Ultrafiltration werden nicht nur die Proteine, sondern auch alle anderen im Urin enthaltenen Stoffe gleichmäßig angereichert, so zum Beispiel auch verschiedene Ionen. Für die Ammoniumionen ist bekannt, daß sie die Biuretreaktion stören können.

Aus diesem Grunde und wegen der oft sehr geringen Eiweißkonzentration im nativen Urin wurde die Methode der Gesamteiweißbestimmung durch Biurets Reagenz modifiziert.

Die Proteine in einer 5 ml-Probe (Harn) wurden mit 1 ml Trichloressigsäure gefällt. Dann wurde zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Der Niederschlag wurde in 0,5 ml 3-prozentiger Natronlauge gelöst und dazu wurden 5 ml Biuret-Reagenz (1) gegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 20° bis 25°C wurde die Extinktion bei 546 nm gegen einen Blindwert aus 5 ml Biuret und 0,5 ml NaOH gemessen.

---

(1) Hersteller: E. Merck, Darmstadt

Eine Eichgerade zu dieser Methode wurde mit der Protein-Standard-Lösung (1) erstellt. Der Meßbereich ging bei diesem Verfahren von 1,0 mg bis 100 mg/100 ml. Wurde ein größerer Eiweißgehalt gemessen, so mußte entsprechend verdünnt und neu angesetzt werden.

Mit dieser modifizierten Methodik wurde ein großer Teil der Fehlbestimmungen ausgeschaltet. Die Ergebnisse stimmten mit der Sulfosalicylsäureprobe überein, und der Quotient aus Eiweißgehalt konzentrierter Urin : Eiweißgehalt nativer Urin bestätigte in diesen Fällen auch den vorher errechneten Konzentrationsfaktor.

Doch auch diese Methode führte nicht bei allen Urinen zu einem Ergebnis. So konnte der Eiweißgehalt der Urine von Patienten mit akuter Hepatitis oder mit Lebercirrhose bei Beeinflussung des Farbumschlags nicht gemessen werden.

In den Urinen von Patienten mit Hepatopathien war ein Teil des Bilirubins an Albumin gebunden, der Eiweißniederschlag war nicht weißlich sondern tiefbraun. In der Träger- und Immunelektrophorese konnte im ungefärbten Präparat zusammen mit der Albuminbande eine braune Bilirubinbande beobachtet werden.

Außerdem ergaben sich in Einzelfällen nach katamnestischer Erhebung Beeinflussungen des Farbumschlags durch Medikamente. Diese Proben blieben dementsprechend bei der weiteren Auswertung unberücksichtigt.

---

(1) Hersteller: Behringwerke, Marburg

3.4.2 Quantitative Bestimmung der freien leichten Ketten durch radiale Immundiffusion nach Mancini

Diese Untersuchung wurde auf Immundiffusionsplatten der Behringwerke durchgeführt (1). Die Partigenplatten enthalten ein monospezifisches Antiserum vom Kaninchen gegen L-Ketten Typ k bzw. gegen L-Ketten Typ λ .

Da diese Immundiffusionsplatten sowohl mit freien leichten Ketten als auch mit gebundenen leichten Ketten reagieren, konnten nur die Urine ausgewertet werden, die kein intaktes Immunglobulin enthielten (siehe Immunelektrophorese).

Zur Standardisierung wurde das Standard-Human-Serum K-Batch Nr. 1001 und K-Batch Nr. B 975 benutzt. (2)

Ausgewertet wurden die Präcipitatringe über eine anhand der Standardwerte erstellte Bezugskurve nach der Arbeitsvorschrift der Behringwerke.

Als Meßbereiche werden für
M-Partigen-Ig L-Kette/Typ k 1,5 E - 18 E /100 ml und für
M-Partigen-Ig L-Kette/Typ λ 2,5 E - 35 E /100 ml angegeben.

---

(1) Immundiffusionsplatten:
M-Partigen-Ig L-Kette/Typ k K-Batch Nr. 3544 A
M-Partigen-Ig L-Kette/Typ λ K-Batch Nr. 3543 A
Hersteller: Behringwerke, Marburg

(2) Hersteller: Behringwerke, Marburg

Da für diese Plasmoproteinsera eine Titerbestimmung problematisch ist, haben die Behringwerke ihre Immundiffusionsplatten mit analytischen Kenndaten versehen. Die angegebenen Kenndaten beziehen sich auf einen Ausgangsstandard der Behringwerke. Dieser Bezugsstandard enthält willkürlich gewählte Einheiten [Diagnostika-Information Nr. D 14/76] .

4 ERGEBNISSE

Gesamteiweißbestimmung:

Die Ergebnisse der Gesamteiweißbestimmung lassen sich folgendermaßen aufschlüsseln:

Normalpersonen	:	1,2 - 13,0 mg / 100 ml
Nephropathien	:	5,6 - 480 mg / 100 ml
Lebercirrhose, Fettleber	:	1,6 - 19,2 mg / 100 ml

Das Gesamteiweiß der Urine von Patienten mit akuter Hepatitis ließ sich mit der Biuretmethode nicht bestimmen.

CAF-Trägerelektrophorese:

Die Trägerelektrophorese ließ sich in nur fünf Fällen sowohl im nativen als auch im konzentrierten Urin durchführen. Hier zeigten die Ergebnisse, daß das Verhältnis von Albumin : a_1 : a_2 : ß : y Globulin vor und nach dem Konzentrieren gleichgeblieben war.

Bei allen anderen Urinen war die Eiweißkonzentration so gering, daß sich auch nach mehrmaligem Auftragen kein Ergebnis erzielen ließ.

In der Trägerelektrophorese ließ sich in keinem Fall eine Bande für ein monoklonales Immunglobulin oder für eine freie leichte Kette erkennen.

Immunelektrophorese:

In der Immunelektrophorese mit Anti-Human-Serum waren in fast allen Konzentraten Albumin-Präcipitatlinien zu finden. Weiter ließen sich Präcipitate gegen Präalbumin, Transferrin, a und ß Globuline und gegen Immunglobuline erkennen.

Bei Urin von Patienten mit Glomerulonephritis und mit nephrotischem Syndrom waren oft wie im Serum Präcipitatlinien gegen sämtliche Proteine vorhanden.

Durch die Untersuchung mit monospezifischen Antisera gegen freie leichte Ketten wurden in 75% aller Konzentrate Präcipitatlinien gegen freie L-Ketten gefunden.

Eine genaue Aufschlüsselung erfolgt in den Tabellen 4.1 und 4.2 .

Radiale Immundiffusion:

Nur etwa die Hälfte aller konzentrierten Urine, bei denen eine freie leichte Kette gefunden worden war, ließ sich mit Hilfe der radialen Immundiffusion auswerten. In allen anderen Konzentraten war noch intaktes Immunglobulin vorhanden. Nur bei vier Urinen ließen sich beide Typen von freien leichten Ketten quantitativ erfassen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

native Urine	Anzahl	keine freien L-Ketten	freie L-Ketten gesamt	freie L-Ketten Typ k	freie L-Ketten Typ k+λ
Normalpersonen	27	27	-	-	-
Glomerulonephritis	10	9	1	1	-
Niereninsuffizienz Nephrot. Syndrom	4	1	3	1	2
Pyelonephritis	3	3	-	-	-
Akute Hepatitis	10	10	-	-	-
Lebercirrhose Fettleber	8	8	-	-	-

Tab. 1: Auftreten von freien leichten Ketten im nativen Urin

konzentrierte Urine	Anzahl	keine freien L-Ketten	freie L-Ketten gesamt	freie L-Ketten Typ k	freie L-Ketten Typ κ→λ
Normalpersonen	27	12	15	10	5
Glomerulonephritis	10	1	9	2	7
Niereninsuffizienz Nephrot. Syndrom	4	0	4	1	3
Pyelonephritis	3	2	1	0	1
Akute Hepatitis	10	1	9	8	1
Lebercirrhose Fettleber	8	1	7	6	1

Tab. 2: Auftreten von freien leichten Ketten im konzentrierten Urin

	Anzahl	nachgew. freie L-Ketten	davon[1] quant. auswertb.	Wertebereich[2] für L-Ketten Typ k (E)	Wertebereich[2] für L-Ketten Typ λ (E)	Verhältnis k : λ
Normalpersonen	27	15	11 (2)	0,05 - 0,48	0,03 - 0,1	3,8 : 1 1,7 : 1
Glomerulonephritis	10	9	2	0,09 - 0,14	—	—
Niereninsuffizienz Nephrot. Syndrom	4	4	0	—	—	—
Pyelonephritis	3	1	0	—	—	—
Akute Hepatitis	10	9	7 (1)	0,07 - 0,38	0,14	2,7 : 1
Lebercirrhose Fettleber	8	7	4 (1)	0,02 - 0,15	0,07	2,1 : 1

1) Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der Urine an, bei denen beide Typen von freien L-Ketten bestimmt werden konnten.

2) Die angegebenen Einheiten sind auf den nativen Urin zurückgerechnet.

Tab. 3: Ergebnisse der radialen Immundiffusion

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Untersuchungsreihe wurden 62 Urine von Patienten, bei denen eine monoklonale Gammopathie ausgeschlossen war, auf das Auftreten von freien leichten Ketten untersucht.

Es zeigte sich, daß die Immunelektrophorese durchgeführt im konzentrierten Urin die empfindlichste Methode ist, um sogenannte Bence-Jones-Proteine nachzuweisen. Mit Hilfe der Trägerelektrophorese auf CAF-Folien ließ sich in keinem Urin eine freie L-Kette auffinden.

Die Immunelektrophorese lieferte in vier nativen Urinen den Nachweis einer freien leichten Kette, nach dem Konzentrieren mit Millipore-Ultrafiltration konnte dagegen in 45 Urinen das Vorhandensein einer freien leichten Kette festgestellt werden. Nur bei 17 Urinen waren keinen freien L-Ketten vorhanden oder die Konzentration an L-Ketten lag unter der Nachweisgrenze, das heißt die Urine ließen sich durch Ultrafiltration nicht weit genug konzentrieren.

In der Mehrzahl wurde allein eine freie leichte Kette vom Typ k gefunden. Freie L-Ketten vom Typ λ wurden nur in den Urinen nachgewiesen, in denen auch Ketten vom Typ k vorhanden waren.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über die Biosynthese der Immunglobuline.

Nach der clonal-selection-Theorie [Burnet, F. M.] gibt es verschiedene Zellklone, die die Fähigkeit besitzen, bestimmte Immunglobuline zu bilden. Diese Zellklone werden durch einen antigenen Reiz dazu angeregt, sich zu teilen und dann Antikörper zu produzieren. Dabei bildet ein Zellklon immer nur einen Typ eines Immunglobulins.

Ein Immunglobulin besteht aus schweren Ketten (H-chains) und aus leichten Ketten (L-chains), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Hierbei bilden H-Ketten den konstanten Teil (Fc) und L-Ketten den antigen-bindenden Teil (Fab) des Moleküls nach Papaindigestion [Putnam, F. W.] .

Die stimulierte Zelle synthetisiert sowohl H-Ketten als auch L-Ketten, die dann innerhalb der Zelle zum fertigen Immunglobulin gekoppelt und von der Zelle abgegeben werden. Die einzelnen Zellklone produzieren einen Überschuß an L-Ketten, der nicht an H-Ketten gebunden werden kann und von der Zelle sezerniert wird. Diese freien leichten Ketten sind als L-chain pool im Serum nachweisbar.

Die leichten Ketten werden in zwei unterschiedlich antigene Hauptgruppen eingeteilt, L-Ketten Typ k und L-Ketten Typ λ [Solomon, A.].

Dabei ist die Menge an L-Ketten Typ k doppelt bis viermal so groß wie die Menge an L-Ketten vom Typ λ [Mason, D. Y.; Laurell, C.-B.; Fahey, J. L.; Berggard, I.] .

Eigene Untersuchungen auf Partigenplatten ergaben k : λ Mengenverhältnisse von 1,7 : 1 bis 3,8 : 1 schwankend.

Ein konstanter Spiegel an Immunglobulinen im Körper wird durch die Regulation von Synthese- und Ausscheidungs- bzw. Abbaurate erreicht. Bei einigen Erkrankungen, zum Beispiel bei chronischen Entzündungen und bei Hepatopathien ist die Syntheserate der Immunglobuline gesteigert, das heißt alle Zellklone sind gleichermaßen stimuliert [Freeman, T.; Sherlock, S.] .

Untersuchungen von Mietinen und Kekki haben gezeigt, daß die angestiegene Syntheserate - untersucht bei Patienten mit Hepatopathien - kaum einen Einfluß auf die Ausscheidungsmenge von freien leichten Ketten im Urin hat.

Eigene Untersuchungen zeigen bei Patienten mit Hepatopathien in qualitativer Hinsicht kaum einen Unterschied zum Vergleichskollektiv, eine vergleichbare quantitative Aussage läßt die gewählte Methode nicht zu.

Im Gegensatz zum vermehrten Auftreten von heterogenen bzw. polyklonalen Immunglobulinen bei bestimmten Erkrankungen produziert bei einer obligaten monoklonalen Gammopathie (Morbus Waldenström, multiples Myelom) ein einzelner Zellklon exzessiv nur ein homogenes Immunglobulin, charakterisierbar durch einen Typ von L-Ketten [Fahey, J. L.] . Dabei findet man auch massiv freie leichte Ketten, das heißt Bence-Jones-Proteine, nur eines antigenen Typs im Urin, die sich oft schon mit weniger empfindlichen Methoden, wie zum Beispiel BJ-Kochprobe, Urinelektrophorese etc. nachweisen lassen.

Die täglichen Ausscheidungsmengen liegen hier über 50 mg/l [Waldenström, J.; Hobbs, J. R.; Dammacco, F.; Kyle, R. A.].

Das Auffinden einer freien leichten Kette ist aber unter Berücksichtigung auch der eigenen Ergebnisse kein spezifisches Diagnostikon für das Vorliegen einer obligaten monoklonalen Gammopathie.

Eine geringe Menge an freien leichten Ketten findet sich in der Regel in jedem Urin. Die Feststellbarkeit richtet sich nach der Sensibilität der Nachweismethode.

Die freien L-Ketten, die als Überschuß bei der normalen Immunglobulinsynthese auftreten, werden in der Niere metabolisiert. Da die isolierten leichten Ketten ein Molekulargewicht von ~ 22 000 und in der dimeren Form von ~ 44 000 haben, werden sie glomerulär filtriert.

Von den Tubuluszellen werden diese freien L-Ketten aus dem Primärharn rückresorbiert und abgebaut, ein weiterer Teil wird von den Tubuluszellen in den Sekundärharn sezerniert [Peterson, P. A.; Poortmans, J.; Jensen, K.; Boesken, W. A.; Shuster, J.; Virella, G.; Randall, R. E.]. Eine eingeschränkte Funktion der Niere und insbesondere der Tubuluspartialfunktion hat deshalb einen großen Einfluß auf die Ausscheidungsmenge an freien leichten Ketten. So wurde zum Beispiel bei der Myelomniere festgestellt, daß bei Tubuluszellatrophie und verstärktem Angebot an L-Ketten Bence-Jones-Proteinzylinder im Tubulussystem verbleiben [Levi, D. F.].

Eigene Untersuchungen zeigen, daß bei Patienten mit Nephropathien freie leichte Ketten der Immunglobuline verstärkt im Urin auftreten. So konnten nur bei Patienten mit einer Nierenschädigung Bence-Jones-Proteine vom k-Typ und vom λ - Typ im nativen Urin gefunden werden.

Zusammenfassend läßt sich auf Grund der eigenen Untersuchungen feststellen:
Freie leichte Ketten der Immunglobuline treten in der Regel auch bei Gesunden im Urin auf. Es werden sowohl Ketten vom Typ k als auch vom Typ λ ausgeschieden. Findet man nur L-Ketten vom Typ k, so bedeutet das nicht, daß keine Ketten vom Typ λ vorhanden sind, sondern daß die Sensibilität der Nachweismethode für freie λ -Ketten nicht ausreicht, denn das Verhältnis von k- zu λ -Ketten beträgt 2 - 4 : 1 .

Berücksichtigt man dieses Mengenverhältnis, so läßt sich schon aus dem Auffinden beider Typen von L-Ketten ein Rückschluß auf die Ausscheidungsmenge führen.

Findet man im nativen Urin freie leichte Ketten beider antigener Typen, so ist eine Nierenschädigung mindestens wahrscheinlich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der 24-Stunden-Sammelurin von Patienten mit Nephropathien, Patienten mit Hepatopathien und einem Vergleichskollektiv wurde auf das Vorkommen von freien leichten Ketten der Immunglobuline - sogenannte Bence-Jones-Proteine - untersucht. Bei diesen Patienten war das Vorliegen einer monoklonalen Gammopathie ausgeschlossen worden.

Durch die Immunelektrophorese mit monospezifischen Antiseren ließ sich in 7% aller Urine eine freie leichte Kette nachweisen. Nach der Konzentration der einzelnen Urine mit Hilfe der Millipore-Ultrafiltration konnte dagegen in 75% aller Urine eine freie leichte Kette gefunden werden.

Die Immunelektrophorese durchgeführt im ankonzentrierten Urin ist damit die empfindlichste Labor-Routinemethode, um speziell Bence-Jones-Proteine zu entdecken.

Weiter wird eine Methode vorgeschlagen zur immunologischen quantitativen Erfassung der leichten Ketten im Urin. Hierdurch ist eine begrenzte Aussage möglich mit hoher Nachweissensibilität. Begrenzt ist die Aussagefähigkeit durch bisher nicht standardisierte Kontrollsera.

Es konnte bestätigt werden, daß freie leichte Ketten der Immunglobuline generell im Urin auftreten. Diese sogenannten Bence-Jones-Proteine entstammen dem normalen Immunglobulinstoffwechsel.

Das Auffinden einer freien leichten Kette ist damit kein spezifisches Diagnostikon für eine obligate monoklonale Gammopathie.

Da die Menge an freien leichten Ketten vom Typ k doppelt bis vierfach so groß ist wie die Menge der freien leichten Ketten vom Typ λ , kann man schon aus dem immunelektrophoretischen Nachweis beider Kettentypen Rückschlüsse auf die Konzentration ziehen.

So läßt das Auftreten beider antigener Kettentypen schon im nativen Urin verdachtsweise auf eine Nierenschädigung schließen.

7 LITERATUR

Behringwerke AG — Partigen Immundiffusionsplatten
D. div. 1140 - Dez. 74 (7137) 50
Behringwerke AG, Frankfurt/M.

Behringwerke AG — Diagnostika Information Nr. D 14/74
Behringwerke AG, Frankfurt/M.

Berggard, I., G. M. Edelmann — Normal counterparts of Bence-Jones proteins: free L polypeptide chains of human gammaglobulin
Proc. nat. Acad. Sci. Washington
49 : 330 (1963)

Berggard, I., P. Peterson — Immunglobulin components in normal human urine
in: Gamma Globulins
Hrsg.: Killander, J., Stockholm
Almqvist & Wiksell (1967)

Boesken, W. H. — Molekulargewichtsbezogene Analyse der Proteinurie als Beitrag zur Diagnose renaler Erkrankungen
Med. Klin. 71 : 441 (1976)

Boesken, W. H. — Die tubuläre Proteinurie
Klin. Wschr. 53 : 473 (1975)

Burnet, F. M. — The clonal selection theorie of acquired immunity
Cambridge University Press,
London 1958

Dammacco, F., J. Waldenström — Bence-Jones proteinuria in benign monoclonal gammapathies: incidence and characteristics
Acta Med. Scand. 184 : 403 (1968)

Dirks, E. — Proteinverlust bei der Peritonealdialyse
Med. Dissert. Düsseldorf 1977

Fahey, J. L. — Antibodies and immunglobulins I
Structure and function
J.A.M.A. 194 : 71 (1965)

Fahey, J. L. — Antibodies and immunglobulins II
Normal developement and changes in disease
J.A.M.A. 194 : 255 (1965)

Freeman, T. — Gamma globulin metabolism in normal humans and in patients
in: Gamma Globulins, Björkman, S. E.
Copenhagen, Munksgaard (1965)

Hobbs, S. R. — Paraproteins, benign or malignant?
Brit. med. J. 3 : 699 (1967)

Jensen, K. — Metabolism of Bence-Jones proteins in non-myeloma patients with normal renal functin
Scand. J. Clin. Laborat. Invest.
25 : 281 (1970)

Kindler, U. — Die immunologische Differenzierung der Gamma-G-, Gamma-A-, Gamma-M- und Gamma-D-Paraproteinämien
in: Serumproteine
Hrsg.: A. Engelhardt, H. Lommel
Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1974

Kyle, R. A., J. E. Maldonado, E. D. Bayrd — Idiopatic Bence-Jones proteinuria - a distinct entity
Am. J. Med. 55 : 222 (1973)

Laurell, C.-B., J. Snigurowicz — The frequency of kappa and lambda chains in pathologic serum γG, γA, γD and γ immunglobulins Scand. J. Haemat. 4 : 46 (1967)

Laux, P. — Proteinverlust durch die Dialysiermembran bei der Haemodialyse Med. Dissert. Düsseldorf 1976

Levi, D. F., R. C. Williams, Jr., F. D. Lindström — Immunofluorescent studies of the myeloma Kidney with special reference to light chain disease Am. J. Med. 44 : 922 (1968)

Lindström, F. D., R. C. Williams, Jr., W. R. Swaim et al. — Urinary light chain excretion in myeloma and other disorders - an evaluation of the Bence-Jones test J. Lab. & Clin. Med. Vol. 71/5 S.812 (1967)

Mason, D. Y. — Measurement of kappa : lambda chain ratios by haemaglutinin techniques J. Immunol. Methods 6 : 273 (1975)

Miettinen, T. A., M. Kekki — Effect of impaired hepatic and renal function on [^{131} I] Bence-Jones protein catabolism in human subjects
Clin. chim. Acta 18 : 395 (1967)

Millipore GmbH — Molekular Filtration AR 801 (1975)
Millipore GmbH, Neu Isenburg

Peterson, P. A., I. Berggard — Urinary immunoglobulin components in normal, tubular and glomerular proteinuria: quantities and characteristics of free light chains, Ig G, Ig A and Fcγ fragment
Europ. J. clin. Invest. 1 : 255 (1971)

Poortmans, J., J. Bienenstock — Synthesis of immunoglobulins and 15 other proteins by diseased human Kidneys
Europ. J. clin. Invest. 5 : 365 (1975)

Putnam, F. W. — Structural evolution of kappa and lambda L chains
in: Gamma Globulins
Hrsg.: Killander, J., Stockholm
Almqvist & Wiksell (1967)

Putnam, F. W. — Structure and evolution of light and heavy chains of immunglobulins
Brookhaven Sympos. Biol. 21 : 306
Cit. no. 3421550 (1968)

Putnam, F. W., K. Titany — Chemical structure of light chains, amino acid sequence of type k BJ proteins
Proc. Roy. Soc. Biol. 166 : 124 (1966)

Randall, R. E., W. C. Williamson, Jr., F. Mullinax et al. — Manifestations of systemic light chain depositon
Am. J. Med. 60 : 293 (1976)

Scheidegger, J. J. — Une micro-methode de l'immuno-électrophorèse
Int. Arch. Allergy 7 : 103 (1955)

Sherlock, S. — The immunology of liver disease
Amer. J. Med. 49 : 693 (1970)

Shuster, J., H. Gutkowski, M. Silvermann — Renal metabolism of Bence-Jones protein (abstr.)
Clin. Res. 18 : 733 (1970)

Solomon, A., J. L. Fahey — Bence-Jones proteinemia. Amer. J. Med. 37 : 206 (1964)

Solomon, A., C. L. Mc Laughlin, J. D. Capra — Bence-Jones proteins and light chains of immunglobulins. J. Clin. Invest. 55 : 579 (1975)

Solomon, A. — Bence-Jones proteins and light chains of immunglobulins (two parts). Medical Progress Vol. 294 1 und 2 (1976)

Vaughan, J. H., R. F. Jacox, B. A. Gray — Light and heavy chain components of gamma globulins in urines of normal persons and patients with agammaglobulinemia. J. Clin. Invest. 46 : 266 (1967)

Virella, G., H. H. Fudenberg — Letter: Light chain nephropathie. N. Engl. J. Med. 294 : 1007 (1976)

Waldenström, J. — Multiple Myeloma. Diagnosis and Treatment. New York - London. Grune & Stratton 1970

Weichselbaum, T. E. — An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounds of blood serum and plasma
Am. J. clin. Pathol.
Techn. Bull. 10 : 40 (1946)

Wetter, O.,
W. Braun,
C. H. Hertenstein — Zur Struktur des Bence-Jones Proteins
Acta haemat. 38 : 147 (1967)

An dieser Stelle möchte ich
Herrn Professor Dr. med. U. Kindler
für die Aufgabenstellung und für Rat
und Unterstützung bei der Durchführung
der Arbeit recht herzlich danken.

LEBENSLAUF

Am 13. Juni 1953 wurde ich in Solingen als Sohn des Kriminalbeamten Gustav Janzik und seiner Frau Ilse, geb. Seeger geboren.

Nach vier Jahren Grundschule (1960 - 61 Grundschule in Wuppertal-Barmen, 1961 - 64 Grundschule in Lank-Latum) besuchte ich ab April 1964 das Gymnasium Fabritianum in Krefeld-Uerdingen und ab 1968 das Lessing-Gymnasium in Düsseldorf.

Hier legte ich im Juni 1972 die Abiturprüfung ab.

Im Oktober 1972 nahm ich das Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf auf.

Im August 1974 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung und im August 1975 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.